

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
NEFROLOGIA

**ANÁLISE DO PERFIL DE RESISTÊNCIA E GENOTIPAGEM DA
Escherichia coli NA INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO NÃO
COMPLICADA**

HOMERO NETO DE CUNHA E AGRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre
2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
NEFROLOGIA**

**ANÁLISE DO PERFIL DE RESISTÊNCIA E GENOTIPAGEM DA
Escherichia coli NA INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO NÃO
COMPLICADA**

HOMERO NETO DE CUNHA E AGRA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia, da Faculdade de Medicina, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas: Nefrologia.

Orientador: Professor Dr. Elvino J. G. Barros

Porto Alegre
2007

“As espécies que sobreviverão ao tempo, não são as mais inteligentes nem as mais fortes, mas aquelas com maior capacidade de adaptação ao meio”.

Charles Darwin

À Clarisse por sua compreensão, amor e companheirismo.

Ao Marcelo, Alexandre e Roberto, razões do meu esforço.

Em memória de Maria e Victor, eterna saudade.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Elvino J. G. Barros, orientador, pelo seu incentivo, paciência e conhecimento. Um grande colega e amigo.

Ao Dr. Roberto Ceratti Manfro, coordenador do Programa de Pós-Graduação, na época de minha admissão, por ter-me aceitado.

Ao doutores Luis Felipe S. Gonçalves, Fernando Saldanha Thomé, José Vanildo Morales, Francisco V. Veronese por suas orientações em aulas e fóruns.

Ao Dr. Mário Wagner e Dra. Daniela Benzano pelo seu trabalho estatístico.

À Dra. Andréia R. de Moura Valim, coordenadora do Curso de Farmácia da Universidade de Santa Cruz do Sul, pelo seu excelente apoio, co-orientação, transmissão de conhecimentos e incentivo, mas, sobretudo, por sua amizade.

Ao Dr. Marion P. da Rocha pela sua ajuda e por suas ótimas idéias.

À Aline Teichmann, aluna do curso de Farmácia da Universidade de Santa Cruz do Sul, pelo seu excelente trabalho.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Curso de Pós-Graduação em Nefrologia, por esta oportunidade de aperfeiçoamento.

À Rute Helena dos Santos, pela sua paciência e inestimável trabalho.

Por fim, um agradecimento especial à Dra. Luciane M. Ferreira que muito ouviu, acompanhou todo o processo e, com grande competência, trabalhou para a melhora da minha auto-estima.

SUMÁRIO

1 REVISÃO DA LITERATURA	10
1.1 INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO.....	10
1.2.1 Fatores bacterianos.....	12
1.2.2 Fatores de risco no adulto jovem para ITU recorrente.....	13
1.2.3 Fatores de risco genéticos	13
1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA.....	15
1.3.1 Adesinas nas fímbrias bacterianas	16
1.4 RESISTÊNCIA.....	17
1.4.1 Fatores de risco para resistência.....	18
1.4.2 Implicações da resistência à SMT.....	19
1.4.4 Variação geográfica	20
1.5 VACINAS E PROBIÓTICOS	21
1.6 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA ITU.....	22
1.6.1 Enterobacterial repetitive intergenic consensus-reação em cadeia da polimerase (ERIC-PCR).....	23
1.6.2 Marcadores moleculares dos fatores de virulência	24
1.6.3 ITU recorrente: mesma cepa <i>versus</i> cepa diferente	26
2 REFERÊNCIAS	27
3 OBJETIVOS	32
3.1 GERAL.....	32
3.2 ESPECÍFICOS.....	32
4 ARTIGO EM PORTUGUÊS: ANÁLISE DO PERFIL DE RESISTÊNCIA E GENOTIPAGEM DA <i>ESCHERICHIA COLI</i> EM MULHERES ADULTAS COM INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO NÃO COMPLICADA.	33
RESUMO.....	34
INTRODUÇÃO.....	34
PACIENTES E MÉTODOS	35
RESULTADOS	37
DISCUSSÃO	39
AGRADECIMENTOS	42
REFERÊNCIAS.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

ITU	-	Infecção do trato urinário
UFC	-	Unidades formadoras de colônias
SMT	-	Sulfametoxazol-Trimetoprim
IDSA	-	Infections Diseases Society of America
<i>E.coli</i>	-	<i>Escherichia coli</i>
UPEC	-	Uropathogenic <i>Escherichia coli</i>
IBC	-	Intracelular bacterial communities
TLR	-	Toll-like receptor
IgA	-	Imunoglobulina A
HLA	-	Human Lymphocytes antigens
THP	-	Tamm-Horsfall protein
DNA	-	Desoxiribonucleic acid
PAI	-	Pathogenicity island
UPEC	-	Uropathogenic <i>Escherichia coli</i>
RNA	-	Ribonucleic acid
t-RNA	-	Transporter Ribonucleic acid
MIC	-	Minimum inhibitory concentration
NAUTICA	-	North American Urinary Tract Infection Collaborative Alliance
RFLP	-	Restriction Fragment Length Polymorphism
PFGE	-	Pulsed Field Gel Electrophoresis
ERIC-PCR	-	Enterobacterial region intergenic consensus
CgA	-	Clonal group A
ExPEC	-	Extraintestinal <i>Escherichia coli</i>
VFs	-	Virulence factors
SNP	-	Single Nucleotide Polymorphism
NCCLS	-	National Committee for Clinical Laboratory Standards

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Perfil de resistência dos isolados de <i>E. coli</i> analisados.	45
Figura 2 - Perfil de resistência por grupo	46
Figura 3 - Visualização da ERIC-PCR em gel de agarose 1,5% que permite observar isolados clones: isolados 38, 43 e 45 pertencentes ao grupo clonal G, isolados 39 e 40 grupo clonal I e isolados 41 e 46 ao grupo clonal Cc.	47
Figura 4 - Dendrograma de 60 isolados obtidos através da análise computacional.	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados clínicos conforme resultado de genotipagem.....	49
Tabela 2 - Apresenta os grupos clonais, a quantidade de isolados e os números de identificação dos isolados (n = 29).....	50

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO

A Infecção do Trato Urinário (ITU) é uma das infecções bacterianas mais comuns afetando 20% das mulheres na idade adulta por ano (1). É acompanhada de importante morbidade associada a significativos custos para o paciente e para a sociedade (2). Ocorre em todas as faixas etárias, da neonatologia à geriatria, mas é particularmente importante, por sua alta prevalência, nas mulheres jovens e sexualmente ativas. É a maior causa de sepsis em pacientes hospitalizados (3-6).

A recorrência da infecção urinária é um fenômeno comum, sendo que aproximadamente 40-50% das mulheres que apresentaram um episódio de infecção urinária terão um ou mais novos episódios durante a vida (7-9).

A causa mais comum de ITU são bactérias gram-negativas que pertencem à família das *Enterobacteriaceae*. Os membros dessa família incluem *Escherichia coli*, *Klebsiella Pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* e *Proteus mirabilis*. A *Escherichia coli* é o agente bacteriano mais frequentemente envolvido nestas infecções sendo responsável por até 80% dos casos de ITU ambulatoriais e 50% dos casos hospitalizados (10,11). As bactérias gram-positivas, como *Staphylococcus saprophyticus* também apresentam um papel significativo como agente etiológico no panorama bacteriano destas infecções, especialmente nas mulheres jovens.

O trato urinário é normalmente um meio estéril. A fonte das bactérias uropatogênicas é freqüentemente da microbiota fecal que colonizam as regiões: perineal, vaginal e periuretral. Por via ascendente, essas bactérias podem colonizar também o trato urinário especialmente nas mulheres que apresentam uma uretra mais curta e, portanto, com maior proximidade com ânus, vestíbulo vaginal e uretra (11,12).

O tratamento de pacientes com infecção do trato urinário pode ser feito com uma grande variedade de antibióticos ou quimioterápicos sendo dada preferência para aqueles com eliminação renal. Os fármacos e o tempo de administração são muito variáveis e dependem de muitos fatores como: custo, farmacocinética, padrão de resistência, condição clínica e imunidade do hospedeiro. É importante lembrar que existem situações onde o resultado da urocultura apresenta o agente etiológico como resistente ao antibiótico prescrito e mesmo assim o paciente responde à terapia. Uma das razões pode ser a alta concentração do antibiótico na urina que é superior àquela encontrada no sangue (5).

Uma preocupação antiga e cada vez mais significativa é em relação ao aumento crescente da resistência bacteriana aos antibióticos comumente prescritos para pacientes com infecção urinária. Brown et al. (13) demonstraram, num estudo em mulheres com cistite não complicada, que a prevalência de resistência à sulfametoxazol-trimetoprim (SMT) variou de 8,1% em 1992 para 15,8% em 1999. Gupta et al. (14), em Seattle, demonstraram esta variação de 9% em 1992 para 18% em 1996. Um estudo multicêntrico, multinacional em 17 países da Europa e Canadá, observou taxas que variaram de 8,7% na Holanda a 35% em Portugal e Espanha. Isto talvez se deva a diferentes condutas na prescrição de antibióticos (15,16). As recomendações da Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA) para ITU não complicada propõem que o uso da SMT deva ser abandonado nas comunidades onde a prevalência de resistência for maior que 20%, devendo-se, então, dar preferência ao uso de fluoroquinolonas (16,17).

Devido à contínua evolução da resistência da *Escherichia coli* aos antibióticos, existe a necessidade de monitorização epidemiológica da resistência desta bactéria nos mais diferentes locais para otimizar a conduta na terapia antibiótica empírica.

1.2 PATOGÊNESE

A interação entre bactéria infectante e características do epitélio do trato urinário é a base da patogênese desta doença. Diversos fatores relacionados a bactérias são fatores predisponentes para o desenvolvimento e recorrência da ITU, incluindo a colonização bacteriana periuretral e virulência da *E. coli*. Fatores de risco relacionados ao comportamento do hospedeiro incluem disfunção do esvaziamento vesical, frequência de relações sexuais, uso de anticoncepcional oral e uso de espermicida. Há também a possibilidade de uma predisposição genética familiar para ITU entre mulheres jovens. A colonização do intróito vaginal com *E. coli* parece ser o passo inicial na patogênese da ITU. As bactérias originam-se da flora fecal e entram na bexiga pela uretra passando por uma fase de colonização periuretral e uretral distal (18).

Vários fatores biológicos, genéticos e comportamentais do hospedeiro parecem predispor mulheres jovens para a ITU não complicada. Mulheres com ITU recorrente têm uma aumentada suscetibilidade para a colonização vaginal com uropatógenos e a colonização com bacilos gram-negativos comparada com mulheres sem história de ITU recorrente (19). Esta diferença entre mulheres com e sem ITU recorrente parece resultar de uma maior propensão para os coliformes uropatógenos aderir às células uroepiteliais da mulher com

infecção recorrente. A causa subjacente desta diferença não foi determinada, embora, em alguns casos, isto possa ser geneticamente determinado.

Foi demonstrado recentemente que as cepas de *E. coli* NU14 e UTI89 formavam biofilmes intracelulares dentro do citoplasma das “umbrella cells”, criando uma saliência na superfície da bexiga dando a aparência de bolsa. A bactéria dentro da bolsa foi descoberta em uma matriz rica em polissacarídeos e exibiu o pili tipo 1 regional. Esta demonstração foi realizada em cepas injetadas em camundongos C3H/HeN e C3H/HeJ (20). A *E. coli* uropatogênica (UPEC) é capaz de formar complexos intracelulares de comunidades bacterianas ou “complex intracellular bacterial communities” (IBC) dentro das células superficiais (umbrella cells) da bexiga. Demonstrou-se através de videomicroscopia com epifluorescência em camundongos infectados que as IBCs formadas pela UPEC progrediam através de 4 distintos estágios de desenvolvimento diferenciados com respeito à taxa de crescimento, comprimento bacteriano, organização das colônias, motilidade e sua eventual dispersão. Na primeira fase a bactéria no IBC não era móvel, tinha formato de bastão e cresceu rapidamente em colônias livres organizadas no citoplasma das “umbrellas cells” da bexiga. Na segunda fase, as colônias de bactérias no IBC maturavam em crescimento mais lento, com comunidades organizadas formando biofilmes, consistindo de bactérias em cocos, que finalmente preenchiam a maior parte do citoplasma. Na terceira fase, a bactéria em estado de biofilme no IBC, era transformada em um fenótipo em forma de bastão móvel, permitindo o desligamento da comunidade e eventual saída da célula do hospedeiro. Na quarta fase a bactéria filameta-se. Esta filamentação parece ser em resposta a um mecanismo de defesa inato mediado por uma “toll like receptor” (TLR4). A bactéria que saiu das células superficiais (umbrella cells) foi capaz de reentrar na cascata de desenvolvimento do IBC, mas com movimentos mais lentos formando um reservatório quiescente. O crescimento intracelular e a filamentação forneceram uma vantagem para a bactéria, ou seja, livrar-se da infiltração de leucócitos polimorfonucleares (20). Deste modo, o desenvolvimento e a maturação da cascata de eventos do IBC têm um importante papel na habilidade de maximizar o número de infecções e sobreviver à resposta imune do hospedeiro (20).

1.2.1 Fatores bacterianos

A *E. coli* uropatogênica tem diversos fatores de virulência que aumentam sua habilidade de colonizar o trato urogenital (21). A ligação à superfície urotelial é um dos fatores que previnem o *washout* pela micção e inicia a invasão bacteriana. Esta fixação é mediada pela adesão FimH localizada no topo da fimbria tipo 1 bacteriana, um aparato filamentososo de

ligação (21). Cepas tipo 1 fimbriadas e P fimbriadas de *E. coli* estão associadas com cistite e pielonefrite respectivamente. Existem evidências clínicas e experimentais para o papel patogênico das fímbrias tipo 1 e fímbrias P de cepas de *E. coli* tanto na persistente colonização vesical como no recrutamento da resposta inflamatória (22,23).

Recentemente, Anderson e colegas (24) mostraram que a bactéria intracelular amadurece em biofilmes, criando “Pod-like bulges” ou edema em forma de bolsa na superfície vesical. Esta organização bacteriana pode explicar a persistência das infecções vesicais apesar das robustas defesas do hospedeiro. Os achados de Elliot et al. (25,21) sugerem que podem existir reservatórios bacterianos na bexiga; usando biópsia, estas bactérias foram identificadas em 14 de 16 pacientes com história de ITU recorrente, mas com urina estéril.

1.2.2 Fatores de risco no adulto jovem para ITU recorrente

A flora genital, circundando o orifício uretral, tem uma forte resistência à infecção por uropatógenos. Na mulher normal, que nunca apresentou ITU, a principal flora no intróito vaginal e uretral consiste de lactobacilos e estafilococos (21). O uso prévio de antibióticos pode alterar essa microflora vaginal normal, facilitando a colonização vaginal pela *E. coli* (21).

Um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento de ITU é o número de relações sexuais. Mais de quatro relações sexuais durante um mês foram associadas com maior número de ITU (21). O uso de espermaticidas e anticoncepcionais orais durante o ano precedente foi mais comum em pacientes com ITU recorrente (26). Tanto a relação sexual como o uso de espermicidas aumentam a colonização periuretral pela *E. coli* e esta colonização é mais típica e por períodos mais prolongados em mulheres com ITU recorrente (21).

1.2.3 Fatores de risco genéticos

Hopkins e colegas (27) descreveram incidência aumentada de ITU entre as mulheres da mesma família com ITU recorrente e sugeriram uma predisposição genética para a doença (27,28). Em um estudo caso-controle com mais de 450 mulheres com ITU recorrente, 47% tiveram uma história maternal de ITU e 22% tiveram um primeiro episódio de ITU antes dos 15 anos de idade; estas variáveis foram associadas com um aumento no risco para ITU recorrente e foram mais fortemente associadas com ITU após relação sexual (29). A história materna de ITU e a história de primeira infecção na infância sugerem que fatores hereditários

possam ser importantes em mulheres com infecção recorrente, especialmente nas que tiveram infecção antes da primeira relação sexual ou exposição à espermatocidas.

Evidências adicionais com referência à predisposição genética para ITU recorrente vêm de estudos de grupos sanguíneos ABH. Mulheres com ITU são mais prováveis ser não-secretoras de antígenos do grupo sanguíneo ABH que aquelas sem ITU recorrente (30). O gene secretor codifica para uma das muitas glicosiltransferases, que determinam a composição de carboidratos das glicoproteínas e glicosíngolipídios, alguns dos quais são também um sítio de ligação para a *E. coli* uropatogênica (31). O epitélio vaginal das não-secretoras expressa dois glicosíngolipídios que se ligam a *E. coli* uropatogênica mais avidamente que outros esfingolipídios. O fenótipo não-secretor seria então super-representado entre meninas e mulheres com ITU recorrente.

O receptor da interleucina-8, CXCR1, é outro fator com variabilidade genética que pode predispor ao desenvolvimento de ITU. A interleucina-8 é uma citocina inflamatória que promove a migração de neutrófilos através das células uroepiteliais infectadas. Uma análise da expressão da interleucina-8 nos neutrófilos de crianças com história de pielonefrite recorrente mostrou uma alteração de CXCR1 que pode explicar sua susceptibilidade à pielonefrite recorrente (32).

Hopkins e colegas (33) demonstraram que fenótipos HLA específicos estavam associados com uma melhor resposta a uma vacina, contendo múltiplos antígenos bacterianos, para controle da ITU. Mulheres que receberam a vacina e tinham outros fenótipos HLA-DR, que não fosse o DR2, apresentaram um maior intervalo entre infecção e reinfeção comparados com mulheres que receberam placebo.

A imunidade inata envolve o “*toll-like receptor*” (TLR), pertencente a uma família de receptores no reconhecimento microbiano. Este reconhecimento se dá através de antígenos específicos bacterianos comuns como lipopolissacarídeos que é um ligante específico para TLR4. Estudos recentes identificaram polimorfismos genéticos da molécula TLR4. Estas variações estruturais geneticamente modificadas poderiam afetar a resposta imune inata à *E. coli* uropatogênica, aumentando ou diminuindo a afinidade do TLR4 aos lipossacarídeos (21,33). Variações na produção do fator de necrose tumoral também são atribuíveis ao polimorfismo em seu promotor e é possível que diferenças na quantidade de fator de necrose tumoral sintetizada em resposta a ITU possa afetar a resistência do hospedeiro à infecção (34).

Mulheres com ITU recorrente mostraram ter baixos níveis de IgA secretora urinária (um importante componente da imunidade da mucosa) comparado com outros anticorpos (35). Entretanto a contribuição da IgA secretora para proteção local contra ITU não é a chave, visto que uma completa insuficiência do sistema IgA secretor não leva a um aumento das taxas de

ITU. Além disso, nenhuma associação de ITU recorrente com distúrbios de excreção de IgA secretor foi encontrada (35).

Bates e colegas (36) demonstraram a capacidade da proteína de Tamm-Horsfall (THP) urinária e receptores uroteliais celulares de competir eficientemente na aderência *E. coli* tipo fimbriada. Esta propriedade reforça a noção que abundante excreção de THP na urina ocorre no hospedeiro para obter uma eficiente defesa contra ITU causada por bactérias uropatogênicas.

Portanto a patogênese da ITU recorrente é complexa e constituída dos três componentes clássicos de qualquer tipo de infecção: hospedeiro, patógeno e meio ambiente.

1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

O trato urinário é normalmente bem protegido contra invasões microbianas por uma variedade de mecanismos de defesa. As cepas bacterianas que causam ITU sintomática em hospedeiros saudáveis possuem diversas propriedades que a tornam capaz de sobrepor-se as defesas locais do hospedeiro, entrar e multiplicar-se dentro do trato urinário (37). Numerosas comparações são feitas em isolados clínicos de *E. coli* de pacientes com cistite, pielonefrite, prostatite, bacteremia, meningite, entre outros, *versus* isolados fecais de hospedeiros saudáveis. Estas análises mostram que os isolados de *E. coli* que derivam do grupo filogenético B2 e D, expressam uma variação restrita de antígenos O, K e H e possuem genes codificando uma ordem diversa de propriedades especializadas que contribuem para a virulência, chamadas fatores de virulência. Estes fatores de virulência incluem as adesinas, os sideróforos, as toxinas, os polisacarídeos, as invasinas e as proteases que tornam a bactéria capaz de ligar-se e lesar células e tecidos do hospedeiro fora do trato intestinal, evitando ou subvertendo os mecanismos de defesa nestes sítios e incitando uma resposta inflamatória no hospedeiro causando a doença extra-intestinal (37).

A adesão bacteriana na mucosa ou células uroteliais é o fenômeno determinante da virulência bacteriana (38-40). Os fatores físico-químicos responsáveis pela adesão bacteriana no trato urinário são complexos (41). A enterobactéria uropatogênica é eletronegativa e é muito pequena para sobrepor-se à repulsão pela rede de carga negativa das células epiteliais. Assim, a ligação bacteriana não ocorre a menos que fímbrias bacterianas ou outra superfície do sistema de adesão estejam presentes. Estes sistemas são menos repelidos pelos microvilos nas células epiteliais que pelo corpo bacteriano. Além disso, estes sistemas são hidrofóbicos como as membranas celulares e a hidrofobicidade favorece a adesão. Uma vez próximos à membrana celular uroepitelial, as fímbrias e a membrana bacteriana submetem-se a uma

ligação irreversível por interação entre adesinas (o ligante) e componentes da célula epitelial, o receptor (42). Estes fatores incluem diversas propriedades de um pequeno grupo de sorotipos O incluindo O1, O2, O4, O6, O7, O16, O18 e O75. Eles estão presentes em aproximadamente 28% dos isolados da flora fecal normal e são responsáveis por 80% dos casos de pielonefrites, 60% dos casos de cistite e 30% de bacteriúria assintomática (43).

1.3.1 Adesinas nas fímbrias bacterianas

Uma vez dentro do trato urinário, a aderência ao uroepitélio permite à bactéria de resistir à ação mecânica de esvaziamento da bexiga através da micção. Existem diversos outros fatores que afetam a uropatogenicidade da *E. coli*; o de maior importância é a presença de adesinas na fímbria bacteriana (também chamada pili) e sobre a superfície bacteriana (42). A maioria das adesinas é de lectinas que reconhecem conformações do sítio de ligação, fornecidos por seqüências de oligosacarídeos, presentes na superfície das células epiteliais. Os três maiores sistemas de aderência foram identificados em cepas de *E. coli* associados com ITU: PAP, AFA e SFA que são reconhecidos por métodos genéticos e moleculares no DNA cromossomal da bactéria, permitindo, assim, uma estimativa da frequência destas adesinas na ITU (44). A adesina PAP, por exemplo, está presente na fímbria P (42). O termo fímbria P deriva do fato que a adesina PAP reconhece o digalactosídeo P, determinante do grupo sanguíneo, nos eritrócitos humanos e células uroteliais, levando a um aumento da adesão.

A ligação da fímbria P aos determinantes do grupo sanguíneo tem importantes implicações para a suscetibilidade do hospedeiro à infecção. Mulheres que são não secretoras de antígenos do grupo sanguíneo (nonsecretors of histo-blood group antigens) mostram aumento *in vitro* da ligação da *E. coli* às células uroteliais e apresentam maior probabilidade de ter ITU recorrente (42). As não-secretoras podem apresentar um processo anormal de receptores de glicolípido gal-globosídeo, resultando na produção de proteínas que se ligam com mais avidéz à *E. coli* (42).

A frequência de operons PAP, SFA e AFA é aproximadamente 75, 25 e 10% na pielonefrite, 45, 20 e 12% na cistite e 24, 27 e 0% na bacteriúria assintomática (44). Detectou-se pelo menos um sistema de adesina em 100% de mulheres jovens com pielonefrite primária e um trato urinário normal (42). Estas observações sugerem que pacientes com ITU, que são infectados com bactéria não-uropatogênica, isto é, sem fímbria P, deveriam ser submetidas a uma investigação de uroimagem para detectar predisposição às anormalidades anatômicas causando infecção como, por exemplo, disfunção neuromuscular da bexiga ou obstrução do trígono vesical (45). A relevância clínica desta sugestão é limitada até o presente, porque os

métodos genotípicos para detecção de adesinas são restritos a poucos laboratórios especializados. No entanto existe a perspectiva de que estes procedimentos possam ser usados rotineiramente.

Além das adesinas, as fimbrias apresentam outras propriedades também virulentas como, por exemplo, a fímbria tipo 1 na *E. Coli*, o qual promove a persistência da infecção pelo aumento da resposta inflamatória (46). A fímbria Dr está correlacionada com tropismo renal e evita a eliminação da infecção. Este efeito é mediado pela ligação a túbulos renais, membrana basal e cápsula de Bowman. O papel das fimbrias tem importantes implicações terapêuticas para prevenção da ITU. Animais vacinados contra adesina FimH desenvolveram anticorpos que inibiram a ligação da *E. coli* às células da bexiga *in vitro* e reduziram a colonização da mucosa da bexiga em mais de 99% dos experimentos (47). Este último efeito foi associado com anticorpos IgG antiFimH na urina. A imunização passiva com soro destes animais também preveniu a colonização.

Outros fatores de virulência incluem presença de flagelo, necessário para a motilidade e a produção de hemolisina, que induz a formação de poros na membrana celular e aerobactina, um sideróforo necessário para a aquisição de ferro no ambiente pobre em ferro do trato urinário (42).

Os respectivos genes são localizados em grandes partes do DNA chamadas ilhas de patogenicidade (“pathogenicity islands” - PAIs). As PAIs formam regiões do genoma das UPECs que estão frequentemente associadas com genes RNA transportador-tRNA. O uso da ordenação do DNA possibilita respostas às perguntas sobre distribuição das PAIs entre várias enterobactérias e sobre a expressão de diferentes genes *in vitro* e *in vivo* (48).

1.4 RESISTÊNCIA

O tratamento da ITU não complicada baseia-se em 2 importantes princípios. Primeiro, o espectro dos organismos causando a ITU aguda é altamente previsível, sendo que a *E. coli* ocorre em 75 a 90% dos isolados e o *S. saprophyticus* em 5 a 15%. Segundo, o padrão de susceptibilidade destes organismos também tem sido relativamente previsível. Baseado nestes princípios, a terapia empírica com SMT tem sido preconizada como uma abordagem para a cistite não complicada (49). Estes princípios têm norteado as escolhas terapêuticas iniciais, enquanto espera-se o resultado do exame cultural da urina. No entanto a resistência aos antibióticos, que tradicionalmente são utilizados no tratamento de pacientes com ITUs, tem aumentado significativamente nos últimos anos de forma diversa em diferentes populações. Por exemplo, a resistência à ampicilina e à amoxicilina tem aumentado na última década de

20% para 40% (49). A resistência à SMT aproxima-se entre 18 a 22% em algumas regiões do mundo (50). No entanto a resistência a outros antibióticos como nitrofurantoína e fluoroquinolonas tem permanecido baixa, porém já com visível aumento, talvez relacionado ao seu uso indiscriminado. Estas tendências têm modificado o manejo da UTI não complicada comunidade-adquirida, especificamente no que se refere ao uso da SMT como agente de primeira escolha para o tratamento empírico da cistite não complicada. Este antibiótico é recomendado somente em áreas onde a prevalência de resistência é menor que 20% (51,52).

As taxas de resistência entre os uropatógenos também variam significativamente em diferentes regiões dos EUA (53), particularmente para agentes como SMT e ampicilina. Entretanto para a nitrofurantoina e as fluoroquinolonas como a ciprofloxacina as taxas de resistência permanecem relativamente baixas e parecem ter menos variações geográficas que outros agentes (53-56).

Uma questão adicional relacionada à resistência antimicrobiana é o grau de resistência cruzada para diferentes agentes antimicrobianos resultando em isolados resistentes a múltiplos fármacos (57-60). Em um estudo de 2000 isolados do trato urinário, 27,5% de 461 isolados resistentes à ampicilina foram também resistentes à SMT, 13,2% foram resistentes à nitrofurantoína e somente 1% foi resistente à ciprofloxacina. Da mesma maneira, de 168 isolados resistentes à SMT, 75,6% foram também resistentes à ampicilina e 8,3% foram resistentes à nitrofurantoína. Em outro estudo (54), foi demonstrado que a prevalência de resistência a múltiplos fármacos entre isolados de *E. coli* do trato urinário nos EUA foi 7,1% e o padrão predominante entre isolados resistentes a múltiplos fármacos incluíram resistência à ampicilina, à cefalotina e à SMT (57,9%).

Estes achados sugerem que à medida que isolados do trato urinário tornam-se resistentes a um antibiótico, eles podem adquirir resistência a diversas classes de diferentes antibióticos não relacionados, tornando a seleção da terapia empírica para a infecção mais difícil (53).

1.4.1 Fatores de risco para resistência

Além dos dados de prevalência de resistência na comunidade local, fatores específicos do hospedeiro podem influenciar o desenvolvimento de resistência à SMT. Wright et al., em 1999, observaram, em pacientes atendidos no setor de emergência com sintomas de cistite aguda, que o risco de ter a infecção urinária causada pela *E.coli* resistente à SMT era cinco vezes maior nas pacientes com Diabete Mellitus, hospitalizadas e tendo feito uso de antibiótico recentemente (55). Outro estudo menor, conduzido no Reino Unido, também encontrou que o uso da SMT nos 6 meses precedentes foi associado com risco aumentado de

ter ITU por organismo resistente e que a Diabete Mellitus não foi um fator independente associado com resistência (56).

1.4.2 Implicações da resistência à SMT

A maioria dos antibióticos usados para tratar ITU alcança concentrações urinárias superiores às concentrações séricas. Por isso, muitas vezes, a bactéria do antibiograma pode ser resistente *in vitro*, mas ocorre uma boa resposta clínica do paciente (49).

Recentemente, alguns estudos têm usado modelos para estimar a evolução e custos associados com resistência *in vitro* (49,52). Em um modelo matemático simples, foi estimado que uma prevalência de resistência de 10% à SMT resultaria em uma taxa de cura clínica de 92% e cura bacteriológica de 89%. A uma prevalência de resistência de 20%, a taxa de cura estimada seria de 88% (clínica) e 84% (bacteriológica). Le e Müller (2001) concluíram que os custos do tratamento empírico da cistite não complicada com SMT tiveram um aumento discreto com taxas aumentadas de resistência à SMT entre isolados de *E. coli*, com custos médios de \$92, \$99, \$106 e \$113, e taxas de resistência de 0%, 10%, 20% e 30% respectivamente. O custo médio do tratamento com fluoroquinolonas foi de \$107, concluindo-se que, a uma prevalência de resistência de 22%, torna-se mais vantajoso financeiramente usar uma fluoroquinolonas em vez de SMT para o tratamento empírico da ITU (52).

Um estudo conduzido em Israel, onde a prevalência de resistência à SMT é estimada em 30 a 40%, mulheres com sintomas de cistite aguda foram tratadas com SMT (160/800) 2 vezes ao dia, durante 5 dias, tendo uma cultura de urina coletada antes do início do tratamento. A taxa de resistência total foi de 29%. A cura bacteriológica foi de 86% nas mulheres com bactérias sensíveis à SMT comparada com 42% das mulheres com bactérias resistentes. A cura clínica foi de 88 e 54% respectivamente. O estudo conclui que a SMT não deve ser usada no caso destes altos índices de resistência.

Os estudos demonstram também que o aumento na resistência à SMT correlaciona-se com pior evolução clínica e bacteriológica quando a terapia com SMT é usada. O uso empírico de SMT para o tratamento da cistite não complicada, deste modo, é recomendado somente nas regiões onde a resistência da *E. coli* à SMT é menor que 20%. Se a resistência for maior que 20%, recomenda-se o uso empírico de fluoroquinolonas em regime de três dias, que demonstra a mesma eficácia. Alternativamente, a nitrofurantoína pode ser usada em regime de 7 dias. A fluoroquinolona também é recomendada para tratamento ambulatorial de pacientes com pielonefrite não complicada, a não ser que haja sensibilidade da bactéria à SMT (49).

Deve-se considerar, por outro lado, que determinar os níveis de resistência à SMT entre as bactérias causadoras de ITU não complicada é problemático, porque estes dados são baseados no antibiograma hospitalar, isto é, o exame quantifica a resistência vista em ambiente de laboratório de microbiologia durante um ano ou parte dele. Entretanto os antibiogramas têm limitações: podem misturar-se a isolados de pacientes internados ou isolados de pacientes ambulatoriais com infecção respiratória ou infecção de ferida ou outros isolados. Além disso, alguns antibiogramas hospitalares consideram múltiplos isolados do mesmo paciente como isolados separados. Visto que amostras múltiplas do mesmo paciente, provavelmente colhidas durante insuficiências de tratamento, havendo a possibilidade de estes momentos estarem associados com resistência antimicrobiana, alguns antibiogramas podem superestimar a resistência aos fármacos. A resistência a antibióticos é mais prevalente em pacientes internados que em pacientes ambulatoriais, portanto os antibiogramas tendem a superestimar a resistência a antibióticos nos casos ambulatoriais (57).

1.4.4 Variação geográfica

Como não existe uma supervisão sistemática para monitoramento do perfil de sensibilidade de isolados de ITU adquiridos na comunidade, poucos dados estão disponíveis aos clínicos com respeito às taxas de resistência em suas áreas específicas. A maioria dos estudos avalia taxas de resistência de uma instituição ou então médias nacionais.

Um sistema de supervisão nacional nos EUA (The Surveillance Network Database) coleta resultados de sensibilidade bacteriana de nove laboratórios distribuídos em nove regiões geográficas no país. Um destes estudos examinou dados especificamente de ITU comunidade-adquirida de mulheres divididas em 2 grupos: entre 15 e 50 anos e acima de 50 anos. Neste estudo houve uma variação geográfica significativa no perfil de resistência da *E. coli* à SMT, com taxas que variaram de 22% nas regiões oeste e sul e em torno de 10% na região nordeste dos EUA. Não houve, porém, variação geográfica significativa nas taxas de resistência à nitrofurantoína ou à fluoroquinolonas. Entretanto existiu uma diferença por grupo de idade: mulheres acima de 50 anos tiveram mais altas taxas de resistência a ambos os fármacos, principalmente devido a uma percentagem aumentada de bactérias não-*E. coli* neste grupo. O estudo NAUTICA (North American Urinary Tract Infection Collaborative Alliance), realizado em 41 centros, 30 centros americanos e 11 centros canadenses, demonstrou que a prevalência de resistência à ampicilina foi de 45,9% e à SMT, de 20,4% entre os isolados destes centros. A resistência a nitrofurantoína foi de 14,3 % em todos os isolados. Este número parece ser mais alto que estudos anteriores, mas há de se esclarecer que neste estudo

NAUTICA houve uma grande percentagem de homens e pacientes acima de 65 anos como também a prevalência de *E. coli* foi de somente 57,5%, o que difere de estudos anteriores. As observações deste estudo multicêntrico, binacional confirmam altas taxas de resistência à ampicilina e à SMT. Além disso, este estudo documenta uma aumentada prevalência de resistência à fluoroquinolonas, particularmente na população idosa. Há, portanto, de acordo com estes estudos, uma significativa variação geográfica nas taxas de resistência dentro dos EUA, confirmando a necessidade da disponibilidade de dados sobre a prevalência de resistência local para auxiliar o médico que trata ITU, principalmente onde o tratamento empírico é usado para a prima infecção. Uma supervisão constante é necessária para avaliar padrões de resistência (61).

1.5 VACINAS E PROBIÓTICOS

Existem 2 diferentes agentes de imunização disponíveis: Urovaxom e Strovac. Ambos são recomendados para pacientes com ITU não complicada recorrente. A Urovaxom é um extrato bacteriano administrado por via oral consistindo de componentes imunoestimulantes derivados de 18 cepas de *E. coli* uropatogênicas (62). Uma metanálise de 5 estudos duplo-cego, placebo controlado, compreendendo 601 mulheres, resultou em uma *odds ratio* de 2,28. As ITU por ano foram reduzidas de 1 para uma taxa de 0,15-0,82 (62). Em um estudo duplo cego, multicêntrico, 453 pacientes foram submetidos ao Urovaxom, o que resultou numa redução de 34% nas ITUs em pacientes tratados com placebo (62), mostrando ser eficaz a imunoterapia com este agente. Uma metanálise mostrou que quando a profilaxia com antibióticos foi comparada com placebo, a redução da ITU recorrente foi de 81% (63). Não existem dados comparando Urovaxom com antibióticos na prevenção da ITU recorrente. A Strovac é um extrato bacteriano celular derivado de cepas de *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterococcus faecalis*. A preparação é administrada por via IM também para prevenção da recorrência de ITU. Um estudo prospectivo comparando 41 pacientes com ITU recorrente não complicada mostrou que a taxa de reinfecção dentro de 6 meses foi 41% em pacientes tratados com esta vacina *versus* 96% em pacientes recebendo placebo (62).

O uso de probióticos vincula profilaxia e tratamento de ITU e é concentrado em *Lactobacillus*. Resultados conflitantes têm sido observados nos ensaios clínicos e em estudos animais devido às cepas inespecíficas de *Lactobacillus* usadas. Resultados positivos têm somente sido obtidos usando cepas bem caracterizadas (62). A aplicação para a profilaxia pode ser via oral ou via intravaginal. Para tratamento, os probióticos foram principalmente

usados na bexiga. Estudos clínicos usando administração vaginal de *Lactobacillus rhamnosis* GR1, em combinação tanto com *Lactobacillus reuteri* B54 ou RC 14, resultou em uma reduzida recorrência de ITU. Em um estudo com 52 mulheres, recorrências de ITU foram reduzidas de uma média de 6 por ano para 1.6, com uso de supositórios vaginal de GR-1/B-54,1 vez por semana (62). Um estudo clínico randomizado, placebo controlado, de 64 mulheres usando ingestão oral de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14, levou a uma significativa redução de uropatógenos na vagina (64). É possível concluir, com estes achados, que a ITU poderia ser prevenida pela ingestão oral de *Lactobacillus* específicos. Porém ainda são poucos os estudos que têm demonstrado resultados positivos no tratamento de ITU com probióticos.

1.6 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA ITU

Epidemiologia convencional é o estudo da doença tal qual ela ocorre na população humana. Por analogia, epidemiologia molecular é o estudo de uma doença infecciosa em relação a selecionadas características genéticas da bactéria causadora (65). Estudos de epidemiologia molecular usam observações estruturadas para identificar traços microbiológicos que predizem a ocorrência, severidade, ou manifestações clínicas de uma doença infecciosa em particular ou características relevantes dos hospedeiros afetados, incluindo idade, sexo e condições predisponentes.

A epidemiologia molecular, desse modo, procura a compreensão em bases moleculares para o comportamento da virulência e preferências da bactéria por determinados hospedeiros, assim como para identificar reservatórios e vias de transmissão, informações que são necessárias para o desenvolvimento de estratégias no que se refere ao manejo e prevenção de um particular tipo de infecção.

Por ser observacional, a epidemiologia molecular examina o fenômeno em seu mundo real, ou seja, bactérias em sua forma selvagem, interagindo com o hospedeiro natural em um ambiente natural (66).

Os traços bacterianos analisados nos estudos de epidemiologia molecular abrangem um espectro de complexidade organizacional, variando da seqüência do DNA subgênico, através de genes, operons, plasmídios e ilhas de patogenicidade a clones, grupos clonais e grupos filogenéticos (66). Cada nível é importante e informativo e cada um requer métodos de tipagens distintos.

Análises da diversidade seqüencial dentro dos genes associados à virulência podem ser feitos usando a Análise de Polimorfismos através da Restrição de Fragmentos ou “Restriction

Fragment Length Polymorphism Analysis” (RFLP), na qual endonucleases de restrição são usadas para detectar seqüência de polimorfismos ou por seqüenciamento direto do DNA. Para análises seqüenciais intragene, o seqüenciamento direto é mais informativo (66).

Clones e grupos clonais são identificados usando métodos de tipagem que expõem o genoma inteiro. O mais discriminatório, exceto o seqüenciamento do genoma é “pulsed-field gel electrophoresis” (PFGE) ou eletroforese de campo pulsado, no qual o DNA bacteriano total é eletroforeticamente separado após digestão com endonuclease de restrição que reconhece um número limitado de sítios genômicos (66). A identidade de dois isolados por análise por PFGE significa que eles representam a mesma cepa ou clone.

1.6.1 Enterobacterial repetitive intergenic consensus-reação em cadeia da polimerase (ERIC-PCR)

Vários métodos de genotipagem de microorganismos são baseados em elementos repetitivos que se interpõem entre os genes, entre eles pode-se citar o ERIC-PCR, utilizado para diferenciar membros de *Enterobacteriaceae* (67). Versalovic e Lupski (1998, *apud* Riley 2004), descreveram o potencial desses elementos repetitivos para diferenciar espécies bacterianas e linhagens por PCR como é o caso da região enterobacteriana repetitiva intergênica (ERIC). As seqüências do ERIC estão dispersas no cromossomo e são localizadas em regiões extragênicas.

A seqüência do ERIC contém 126 pares de bases altamente conservados que se repetem no genoma de *E. coli* (67). A estratégia utilizando ERIC-PCR pode discriminar linhagens em nível de subespécies devido à ampla distribuição desses elementos no genoma de vários membros das enterobactérias (67).

A estratégia baseada no ERIC-PCR foi utilizada em um estudo de ITU adquirida na comunidade entre mulheres americanas e demonstrou ser simples, apresentando moderado poder discriminatório. Os autores tipificaram um grande número de isolados de *E. coli* e identificaram um grupo clonal prevalente, chamado de CgA. As linhagens pertencentes a este grupo caracterizaram vários isolados provindos de uma origem comum. O grupo clonal CgA foi confirmado por um segundo método de genotipagem, mostrando que as linhagens definidas como pertencentes ao mesmo grupo clonal por ERIC-PCR estavam relacionados entre si (68).

O ERIC-PCR foi aplicado para analisar isolados de *E. coli* provenientes de casos de pielonefrite e foi descoberto que a mesma linhagem CgA foi identificada como responsável

em uma substancial proporção de infecções. Assim a tipagem de linhagens identificou um espectro de doenças extra-intestinais causadas por este grupo clonal de *E. coli* (67).

A identificação de relação epidemiológica para as linhagens ExPEC pode identificar características específicas que, por sua vez, podem explicar a patogenia das doenças extra-intestinais. A possibilidade de diferenciar organismos ExPEC é bastante recente e pode auxiliar na definição de estratégias para controlar ou até mesmo evitar as ITUs (67).

1.6.2 Marcadores moleculares dos fatores de virulência

Isolados de *E. coli* da urina de pacientes com ITU ou do sangue ou do líquido cefalorraquidiano, entre outras amostras clínicas, de pacientes com diversas outras infecções extra-intestinais, exibem uma maior prevalência de marcadores moleculares específicos que de isolados fecais de hospedeiros não infectados (66). Tais marcadores são comumente referidos como “fatores de virulência” (VFs), embora isto deva ser entendido como significantes “fatores associados com”, não necessariamente “contribuindo para” a virulência, visto que associações epidemiológicas não são garantias de causalidade.

Estes VFs podem ser agrupados por categoria funcional como, por exemplo, as adesinas (69), os sistema sideróforo (66), as toxinas (66), os polisacarídeos de superfície (66), as invasinas (66) e os traços associados à resistência (66). Os isolados clínicos freqüentemente contêm múltiplos VFs de uma particular categoria funcional.

Certos VFs comumente ocorrem juntos em padrões sugerindo tanto co-seleção ou direta linhagem genética (70). A linhagem dos VFs tem sido demonstrada dentro das *pathogenicity islands* (PAIs) e em plasmídios (66). As cepas ExPEC (*E. coli* patogênica extra-intestinal) freqüentemente contêm múltiplas PAIs, cada uma com uma distinta combinação de VFs, os quais, às vezes, resultam numa cepa contendo múltiplas combinações de um particular VF, por exemplo, *pap* (71).

Certos grupos clonais de ExPEC, tradicionalmente identificados por sorotipo O:K:H, são super-representados entre os isolados clínicos quando comparados com controles fecal (66). Estes grupos clonais virulentos derivam primariamente do filogenético grupo B2 e a uma menor extensão ao grupo D, explicando a predominância dos grupos B2 e D entre os isolados clínicos (66).

A maioria dos VFs tradicionalmente reconhecidos (*pap*, *sfa/foc*, *hly*, e *kps*) estão concentrados dentro desses virulentos grupos clonais e estão dentro de grupo filogenético B2 e/ou D, enquanto outros (*afa-dra*, *iuc/iut* e *traT*) são mais amplamente distribuídos (66). Este padrão divergente de distribuição filogenética corresponde à transmissão vertical (dentro-

linhagem) *versus* horizontal (entre linhagens) e reflete a localização cromossomal *versus* plasmidial dos respectivos VFs.

Comparações epidemiológicas moleculares podem ser feitas entre isolados para (i) pacientes com diferentes síndromes clínicas (70) (ii), hospedeiros infectados que mostram ou deixam de mostrar condições predisponentes (72) ou (iii) diferentes hospedeiros (66). Estas comparações levam a certas conclusões como, por exemplo, as síndromes mais severas como a pielonefrite quando comparadas com as menos severas como cistite; usualmente envolvem cepas com maior virulência molecular como refletido no número de Vfs.

A expressão da virulência do gene pode ser importante nos estudos moleculares epidemiológicos, porque a expressão é necessária para o genótipo influenciar virulência fenotípica. A expressão do operon *fim* (fímbria tipo 1) é regulada por elemento invertível de troca (“invertible switch element”), posição da qual pode ser definida via um simples exame por PCR (73).

A variação na seqüência dentro de um gene pode produzir importantes alterações patogênicas, fenotípicas no peptídeo codificado, por exemplo, os diversos polimorfismos na *fimH* (fímbrio-adesina tipo 1) quando detectados pela análise da seqüência ou por SNP PCR específico (“single nucleotídeo polimorfismo”), os quais causam alterações nos aminoácidos, na fímbria que produz uma mudança de um fenótipo ligado a tri-manose (comensal) para fenótipo ligado a mono-mannose (ITU associado) (66).

Os VFs têm sido estudados como potenciais preditores clínicos para orientar o manejo do paciente. Por exemplo, a fímbria P (ou *pap*) tem sido proposta como uma maneira para identificar meninos de risco para desenvolver cicatriz renal (66), adultos com pielonefrite ou urosepses que têm condições predisponentes não reconhecidas (66) e pacientes cujos parceiros de moradia deveriam ser rastreados como portadores de cepas da ITU (66). Outras aplicações propostas para este teste seriam a definição do tempo de tratamento para crianças (74) e a identificação de mulheres grávidas de risco para o desenvolvimento de pielonefrite (66).

O recentemente descrito *E. coli* grupo clonal A, embora exibindo resistência a multifármacos e ocorrendo para 33 a 50% de recente *E. coli* SMT resistente, entre mulheres com cistite não complicada ou pielonefrite em alguns centros dos EUA, está repleto de VFs que presumivelmente contribuem para o sucesso deste grupo clonal como uma bactéria entre diferentes indivíduos sadios.

De acordo com a hipótese fecal-vaginal-uretral cepas de *E. coli* causando ITU derivam da flora perineal e fecal do próprio paciente (75). Isto significa que a colonização fecal e

vaginal com um organismo é um fator de risco potencialmente modificável para ITU subsequente.

1.6.3 ITU recorrente: mesma cepa *versus* cepa diferente

Em um estudo, 68% das ITU recorrentes foram causadas por uma cepa previamente identificada numa pessoa em particular; entretanto esta percentagem variou de 55% (para mulheres com duas recorrências) a 78% (para aquelas com >6 recorrências (66). A maioria das recorrências com mesma cepa não envolve evidente persistência dentro do trato urinário e sim evidências sugere um reservatório externo para a reinfecção (66).

Esta distinção entre recorrências pela “mesma cepa” e “diferente cepa” pode ser clinicamente relevante, porque múltiplos episódios de ITU independentes sugerem uma predisposição subjacente (66) enquanto recorrências pela mesma cepa sugerem a necessidade de identificar e erradicar um persistente (interno ou externo) reservatório. Potenciais reservatórios endógenos incluem a persistência intracelular a longo prazo de uma cepa dentro do epitélio da bexiga.

Fontes do ambiente de *E. coli* uropatogênica têm sido investigadas usando “fingerprinting” molecular com ou sem detecção de VF ou análise filogenética. Cepas compartilhadas entre membros da mesma casa têm sido demonstradas entre adultos parceiros sexuais, entre pais e crianças e até entre seres humanos e animais (66). Algumas evidências sugerem que o que classicamente tem sido uroVF também prediz co-colonização de hospedeiros associados epidemiologicamente, significando que eles podem promover transmissão pessoa a pessoa.

A transmissão sexual é suportada pela associação estatística de certas práticas sexuais com co-colonização de parceiros sexuais adultos e pelos sítios anatômicos da colonização pela mesma cepa (66). Entretanto a transmissão sexual é improvável para explicar a co-colonização envolvendo crianças e animais de estimação (66). Outro possível mecanismo inclui transmissão pessoa a pessoa via rota fecal-oral e a aquisição coordenada de uma fonte externa como, por exemplo, suprimentos alimentares.

Concluindo, análises epidemiológicas moleculares, baseadas na observação da *E. coli* como ocorrem na natureza, fornecem um complemento importante para a contribuição experimental. A rápida descoberta de novos VFs e o aumento da importância de sua expressão e variantes moleculares dos VFs fornecem abundante estímulo para futuros estudos epidemiológicos moleculares.

2 REFERÊNCIAS

1. Franco AVM. Recurrent urinary tract infections. *Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 2005;19(6):861-73.
2. Johnson JR, Manges AR, O'Bryan TT, Riley, LW. A disseminated multidrug-resistant clonal group of uropathogenic *Escherichia coli* in pielonephritis. *Lancet* 2002;359:2249-51.
3. Franz M, Horl WH. Common errors in diagnosis and management of urinary tract Infection I: Pathophysiology and diagnostic techniques. *Nephrol Dial Transpl* 1999;14:2746-53.
4. Rubin RH, Cotran RS, Tolkoff-Rubin NE. Urinary tract infection, pyelonephritis and Reflux Nephropathy. In Brenner BM and Rector FC. *The Kidney – Seventh Edition - vol. 2* Saunders Co 2004;1513-69.
5. Barros EJG, Manfro RC, Thomé FS, Gonçalves LF. *Nefrologia: Rotinas, diagnóstico e tratamento 2ª ed.*: Editora Artes Médicas 1999;357-65.
6. Karram MM, Mallipeddi PK. Lower urinary tract infection. In Walters MD and Karram MM (eds) *Urogynecology and Reconstructive Pelvic Surgery*, 2nd edn. Mosby: StLouis 1999;341-53.
7. Hooton TM, Scholes D, Hughes JP, et al. A prospective study of risk factors for symptomatic urinary tract infection in young women. *New England Journal of Medicine* 1996;335:468-74.
8. Brown PD. Antibiotic selection for urinary tract infection. *Current Infections Disease Reports* 1999;1(4):384-88.
9. Stapleton A. Prevention of urinary tract infection in women. *Lancet* 1999;353:7-8.
10. Nicolle LE. Urinary tract pathogens in complicated infection in elderly. *J Infec Dis* 183(Suppl1): S5-8, 2001.
11. Söderhäll M. The importance of *Escherichia coli* fimbriae in Urinary tract infection. Thesis: Department of Nephrology, Karolinska Hospital, Stockholm Sweden, 2001.
12. Svanborg C, Godaly G. Bacterial virulence in Urinary tract infection. *Infection Dis Clin North Am* 1997;11(3): 513-29.
13. Brown PD, Freeman A, Foxman B. Prevalence and predictors of Trimetoprim-Sulfamethoxazole resistance among uropathogenic *Escherichia coli* isolates in Michigan. *Clinical Infections Diseases* 2002;34:1061-6.
14. Gupta K. Addressing antibiotic resistance. *Dis Mon* 2003;49:99-110.
15. Kahlmeter G. The Ecosens Project: a prospective, multinacional, multicentric, epidemiologic survey of the prevalence and antimicrobial susceptibility of urinary tract pathogens. *J Antimicrob Chemother* 2000;46 Suppl 1:15-22.

16. Nicolle LE. Urinary tract infection: Traditional Pharmacologic Therapies. *Dis Mon* 2003;40:111-28.
17. Naber KG. Which fluoroquinolones are suitable for the treatment of urinary tract Infections? *International Journal of Antimicrobial Agents* 2001;17:331-41.
18. Brummfitt W, Gargan RA. Periuretral enterobacterial carriage preceding urinary infection. *Lancet* 1987; 1:824-26.
19. Pfau A, Sacks T. *J Urol* 1981 Schaeffer AJ, Staemey TA. The bacterial flora of the vaginal vestibule, urethra and vagina in premenopausal women with recurrent urinary tract infections *J Urol* 1981; 126:630-34.
20. Justice SS, Hung C, Theriot J, Fletcher D. Differentiation and developmental pathways of UPEC in urinary tract pathogenesis *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(5):1333-8.
21. Finer G, Landau D. Pathogenesis of urinary tract infections with normal female anatomy. *Lancet Infect Dis* 2004;4(10):631-5.
22. Wullt B. The role of P fimbriae for *Escherichia coli* establishment and mucosal inflammation in the human urinary tract. *Int J Antimicrob Agents* 2003;21(6):605-21.
23. Jantunen ME, Saxen H. Recurrent urinary tract infections in infancy: relapses or reinfections? *J Infect Dis* 2002;185:375-9.
24. Anderson GG, Palermo JJ, Schilling JD, Roth R, Heuser J, Hultgren SJ. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science* 2003;301(5629):105-7.
25. Elliot TS, Reed L, Slack RC, Bishop MC. Bacteriology and ultrastructure of the bladder in patients with urinary tract infections. *J Infect* 1985;11:191-9.
26. Foxman B, Manning SD, Tallman P. Uropathogenic *Escherichia coli* are more likely than commensal *E.coli* to be shared between heterosexual sex partners. *Am J Epidemiol* 2002;156:1133-40.
27. Hopkins WJ, Uehling DT, Argowski DS. Evaluation of a familial predisposition to recurrent urinary tract infection in women. *Am J Med Genet* 1999;83:422-4.
28. Stauffer CM, van der Weg B, Donadini R, Ramelli GP. Family history and behavioral abnormalities in girls with recurrent urinary tract infections: a controlled study. *J Urol* 2004;171:1663-5.
29. Scholes D, Hooton TM, Stapleton AE, Gupta K, Stamm WE. Risk factors for recurrent UTI in women. *J Infect Dis* 2000;182:1177-82.
30. Ishitoya S, Yamamoto S, Mitsumori K, Ogawa O, Terai A. Non secretor status is associated with female acute uncomplicated pyelonephritis. *BJU Int* 2002;89:851-4.
31. Stapleton A, Hooton TM, Fennel C, Roberts PL, Stamm WE. Effect of secretor status on vaginal and rectal colonization with fimbriated *Escherichia coli* in women with and without recurrent urinary tract infection. *J Infect Dis* 1995;171:717-20.
32. Frendeus WJ, Godaly G, Hang L, Svanborg C. Interleukin-8 receptor deficiency confers susceptibility to acute pyelonephritis. *J Infect Dis* 2001;183:556-60.

33. Hopkins WJ, Heisey DM, Uehling DT. A comparative study of major histocompatibility complex and red blood cells antigen phenotypes as risk factors for recurrent urinary tract infections in women. *J Infect Dis* 1998; 177:1296-301.
34. Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism affects transcription. *Mol Immunol* 1997;34:391-9.
35. James-Ellison MY, Roberts R, Topley N. Mucosal immunity in urinary tract: changes in sIgA, FSC and total IgA with age and urinary tract infection. *Clin Nephrol* 1997;48:69-78.
36. Bates JM, Raffi HM, Prasad K. Tamm-Horsfall protein knockout mice are more prone to urinary tract infection. *Kidney Int* 2004;65:791-7.
37. Johnson JR. Microbial virulence determinants and the pathogenesis of urinary tract infection. *Infect Dis Clin N Am* 2003;17:261-78.
38. Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. How bacteria stick. *Sci Am* 1978;238:86.
39. Schoolrik GK. How *Escherichia coli* infects the urinary tract. *N Engl J Med* 1989;320:804.
40. Svanborg Eden C, Hagberg L, Hanson LA. Bacterial adherence: A pathogenic Mechanism in urinary tract infections caused by *E. coli*. *Progr Allergy* 1983;33:159.
41. Roberts JA. Bacterial adherence and urinary tract infection. *South Med J* 1987;80:347.
42. Meyrier A, Zaleznik D. UpToDate 12.1, 2004.
43. Hanson LA. Prognostic indicators in childhood urinary infection. *Kidney Int* 1982;21:659.
44. Le Bouguenec C, Lalioui L, du Merle L. Characterization of AfaE adhesions produced by extraintestinal and intestinal human *E.coli* isolates: PCR assays for detection of Afa adhesions that do or do not recognize Dr blood group antigens. *J Clin Microbiol* 2001;39(5):1738-45.
45. Roberts JA. Reflux nephropathy follows obstruction or infection. *Semin Urol* 1986;4:70.
46. Connel H, Agace W, Klemm P. Type 1 fimbrial expression enhances *E.coli* virulence for the urinary tract. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9827.
47. Langermann S, Palaszynski S, Barnhart M. Prevention of mucosal *Escherichia coli* infection by FimH-adhesin-based systemic vaccination. *Science* 1997;276:60.
48. Oelschlaeger TA, Dobrindt U, Hacker J. Pathogenicity islands of uropathogenic *E.coli* and evolution of virulence. *Int J Antimicrob Agents* 2002;19(6):517-21.
49. Gupta K. Addressing Antibiotic Resistance. *Dis Mon* 2003;49:99-110.
50. Gupta K, Sahm DF, Mayfield D, Stamm WE. Antimicrobial resistance among uropathogens that cause community-acquired urinary tract infections in women: a nationwide analysis. *Clin Infect Dis* 2001;33:89-94.

51. Warren JW, Abrutyn E, Hebel R, Johnson JR, Schaeffer AJ, Stamm WE. Guidelines for antimicrobial treatment of uncomplicated acute bacterial cystitis and acute pyelonephritis in women. *Clin Infect Dis* 1999;29:745-58.
52. Le TP, Miller LG. Empirical therapy for uncomplicated urinary tract infections in Era of increasing antimicrobial resistance: a decision and cost analysis. *Clin Infect Dis* 2001;33:615-21.
53. Mazzuli T. Resistance trends in urinary tract pathogens and impact on management. *The Journal of Urology* 2002;168:1720-2.
54. Sahm D, Thornsberry C, Mayfield D, Jones M, Karlowsky J. Multidrug-resistant Urinary tract isolates of *Escherichia coli*: Prevalence and patient demographics in the United States in 2000. *Antimicrobial Agents Chemother* 2001;45(5):1402-6.
55. Wright SW, Wrenn KD, Haynes ML: Trimetoprim-sulofametoazole resistance Among urinary coliforms isolates. *J Gen Intern Med* 14(10):606-9, 1999.
56. Steinke DT, Seaton RA. Factors associated with trimethoprim-resistant bacteria Isolated from urine samples. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1999;43:841-3.
57. Miller LG, Tang AW. Treatment of uncomplicated urinary tract infections in an Era of increasing antimicrobial resistance. *Mayo Clin Proc* 2004;79(8): 1048-54.
58. Sobel JD, Kaye D. Urinary tract Infections. In: Mandell GI, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infections Diseases*, 4th ed. Philadelphia, Pa: Churchill Livingstone 1995;662-90.
59. Raz R, Chazan B, Kennes Y, Stamm W. Empiric use of TMP-SMX in treatment of women with uncomplicated urinary tract infections,in geographical area with a high prevalence of TMP-SMX-resistant uropathogens. *Clin Infect Dis* 2002;34:1165-9.
60. Hooton TM, Besser R, Foxman B, Fritsche TR, Nicolle LE. Acute uncomplicated Cystitis in a Era of increasing antibiotic resistance: a Proposed approach to empirical therapy. *Clin Infect Dis* 2004;39:75-80.
61. Zhanel GG, Hisanaga TL, Laing NM, De Corby MR, Nichol KA, Palatnick P, Hohnson J, Noreddin A, Harding KM, Nicolle LE, the NAUTICA Group, Hoban DJ: Antibiotic resistance in outpatient urinary isolates:final results from Morth American Urinary Tract Infection Collaborative Alliance (NAUTICA). *International Journal of Antimicrobial Agents* 2005;26:380-8.
62. Wagenlehner FME, Naber KG. Treatment of bacterial Urinary tract infections: Presence and future. *European Urology* 2006;49:235-44.
63. Albert X, Huertas I, Pereiro II, Sanfelix J, Gosalbes V, Perrota C. Antibiotics for Apreventing recurrent urinary tract infection in non-pregnant women. *Cochrane Database Syst Rev* 2004;(3):CD001209.
64. Reid G, Charbonneau D, Erb J. Oral use of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14 significantly alters vaginal flora:randomized, placebo controlled trial in 64 healthy women. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003;35(2):131-4.

65. Burman WJ, Breese PE, Murray BE, Mehler PS. Conventional and molecular epidemiology of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance among urinary *Escherichia coli* isolates. *Am J Med* 2003;115:358-64.
66. Johnson JR, Russo TA. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology* 2005;295:383-404.
67. Riley LW. *Molecular Epidemiology of Infections Diseases-Principles and Practice*, 2004. ASM Press, Washington, DC.
68. Manges AR, Johnson JR, Foxman B, Riley LW. Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group. *The New England Journal of Medicine* 2001;345(14):1007-13.
69. Mitsumori K, Terai A, Yamamoto S, Yoshida O. Identification of S, F1C and three Pap G fimbrial adhesions in uropathogenic *Escherichia coli* by polymerase chain reaction. *FEMS Immunol. Med. Microbiol* 1998;21:261-8.
70. Kanamura S, Kurazono H, Ishitoya S, Yamamoto S. Distribution and genetic association of putative uropathogenic virulence factors *iron*, *iha*, *kpsMT*, *ompT* and *usp* in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in Japan. *J Urol* 2003;170:2490-3.
71. Welch R, Burland V, Plunkett GR, Blattner FR. Extensive mosaic structure revealed by complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:17020-4.
72. Johnson JR, Kuskowski MA, O'Bryan TT, Maslow JN. Epidemiological correlates of virulence genotype and phylogenetic background among *Escherichia coli* blood isolates from adults with diverse source bacteremia. *J Infect Dis* 2002;185(10):1439-47.
73. Gunther NWT, Lockett V, Johnson DE, Mobley HL. In vivo dynamics of type 1 fimbria regulation in uropathogenic *Escherichia coli* during experimental urinary tract infection. *Infect Immun* 2001;69:2838-46.
74. Tambic T, Oberiter V, Delmis J, Tambic A. Diagnostic value of P-fimbriation test in determining duration of therapy in children with urinary tract infections. *Clin Ther* 1992;14:667-71.
75. Johnson JR, Kaster N, Kuskowski MA, Ling GV. Identification of urovirulence Traits in *Escherichia coli* by comparison of urinary and rectal *E.coli* isolates from dogs with urinary tract infection. *J Clin Microbiol* 2003;41:337-45.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar as características clínicas e os aspectos microbiológicos da *E.coli* em pacientes femininas adultas com infecção do trato urinário (ITU) não complicada.

3.2 ESPECÍFICOS

Analisar o perfil de resistência da *E. coli* aos antibióticos mais usados no tratamento de pacientes com ITU não complicada.

Caracterizar os isolados de *E. coli* através de genotipagem pela técnica de reação em cadeia de polimerase, baseada na região consenso repetitiva, o ERIC-PCR.

Associar os dados clínicos dos pacientes portadores de ITU com resultados da genotipagem e perfil de resistência a cinco antibióticos mais usados.

4 ARTIGO EM PORTUGUÊS: ANÁLISE DO PERFIL DE RESISTÊNCIA E GENOTIPAGEM DA *ESCHERICHIA COLI* EM MULHERES ADULTAS COM INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO NÃO COMPLICADA.

**Homero N. de C. e Agra¹, Andréia Rosane de Moura Valim², Aline Teichmann³,
Elvino J.G. Barros¹**

1. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia, Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.
2. Coordenadora do Curso de Farmácia da Universidade de Santa Cruz - UNISC
3. Aluna do Curso de Farmácia da Universidade de Santa Cruz - UNISC

Endereço para correspondência:

Dr. Homero Agra
Rua Marechal Deodoro 1015 Centro
96810110
Santa Cruz do Sul-RS
Brasil
E-mail: unirim.agra@viavale.com.br

RESUMO

Introdução - A Infecção do Trato Urinário (ITU) é uma das doenças mais comuns, especialmente em mulheres jovens e sexualmente ativas, causada, na maioria das vezes, pela *Escherichia coli*. Este estudo objetiva analisar os fatores de risco associados com este tipo de infecção, além de estudar o perfil de resistência à genotipagem da *E. coli*.

Pacientes e métodos - Foram avaliados 62 pacientes femininas, residentes em Santa Cruz do Sul, com idade variando entre 18 a 84 anos, com o diagnóstico ambulatorial de ITU não complicada. O diagnóstico foi estabelecido na presença de sintomas urinários e urocultura com a contagem superior a 10^5 UFC/mL. Os pacientes responderam a um questionário para obtenção de dados clínicos. A sensibilidade dos isolados de *E. coli* frente aos antimicrobianos foi determinada usando o método de difusão em disco em meio Mueller Hinton. A genotipagem foi realizada através da técnica de reação em cadeia da polimerase baseada na região consenso repetitivo intergênica.

Resultados: O perfil de resistência bacteriana aos antibióticos testados foi de 22,6% para a sulfametoxazol-trimetoprim, 19,3% para a cefalexina, 8,1% para a norfloxacina, 4,8% para a gentamicina e 3,2% para a nitrofurantoína. A genotipagem revelou que 43,5% dos isolados clínicos de *E. coli* apresentavam relação clonal. A comparação dos dados clínicos dos pacientes que eram portadores de cepas formadoras de clones com os que não eram, revelou que não houve diferença entre os dois grupos em relação ao perfil de resistência, idade da primeira infecção urinária, atividade sexual, história de doença renal no passado, número de episódios de ITU, hospitalização, uso prévio de antibióticos nos últimos 2 meses e presença de animal de estimação em casa. A análise dos grupos classificados pelo resultado da genotipagem quanto ao perfil de resistência revelou que não há diferença estatisticamente significativa nos níveis de resistência à cefalexina, à gentamicina, à nitrofurantoína, à norfloxacina e à sulfametoxazol-trimetoprim nos diferentes clones observados.

Conclusão: O perfil de resistência da *E. coli* aos antibióticos testados mostrou altos níveis de resistência à SMT e à cefalexina. A genotipagem da *E. coli* identificou, em 43,5% dos isolados, a presença de uma relação clonal embora não tenha sido observado uma associação da relação clonal com perfil de resistência e variáveis clínicas.

Palavras-chave: infecção do trato urinário, *Escherichia coli*, resistência bacteriana, genotipagem, ERIC-PCR.

INTRODUÇÃO

A infecção do trato urinário (ITU) é a infecção bacteriana mais comum na mulher e induz à significativa morbidade e altos custos para sociedade (1). O agente etiológico mais freqüentemente envolvido na etiologia da ITU é a *Escherichia coli* ocorrendo em 75 a 90% dos casos de infecções adquiridas na comunidade (1,2).

O uso da sulfametoxazol/trimetoprina (SMT) continua sendo uma das principais estratégias no tratamento empírico destes pacientes (1,3,4). Além de atingir altas concentrações urinárias ela erradia a colonização perineal bacteriana, além de apresentar baixos custos (1,4). No entanto com o aumento da resistência da *E. coli* a este antibiótico, outras alternativas têm sido utilizadas como tratamento inicial e empírico da infecção urinária (1,5). Atualmente recomenda-se terapia empírica para ITU não complicada em mulheres

adultas com um curso de SMT por 3 dias nos casos onde a prevalência de resistência a este antibiótico for menor que 20%(4,5). As terapias alternativas incluem fluoroquinolonas ou a nitrofurantoína.

Há décadas a resistência bacteriana tem se tornado um problema para a escolha do antibiótico, dificultando, muitas vezes, o adequado manejo terapêutico dos pacientes com infecções causadas por *E. coli*. O estudo NAUTICA (3) avaliou a suscetibilidade da *E. coli* aos antibióticos mais usados para ITU em pacientes ambulatoriais em 40 centros nos EUA e Canadá e revelou que a resistência à ampicilina foi 37,7%; à SMT, 21,3%; à ciprofloxacina, 5,5%; à levofloxacina, 5,1% e à nitrofurantoina, 1,1%. O estudo também concluiu que há considerável variabilidade geográfica no perfil de resistência a *E.coli* e uma contínua evolução para uma maior resistência ao longo dos anos (4).

Estudos de epidemiologia molecular têm sido de utilidade para esclarecer a relação bactéria-hospedeiro, as bases filogenéticas, os reservatórios e as vias de transmissão da *E. coli*, assim como a análise dos fatores de virulência e resistência aos antibióticos (6,7). Este tipo de metodologia tem auxiliado na identificação das características específicas de doenças infecto-contagiosas que, por sua vez, podem explicar a sua patogenia e a dinâmica de transmissão. Vários métodos de genotipagem de microorganismos são baseados em elementos repetitivos que se interpõem entre os genes, entre eles pode-se citar a ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus). A estratégia utilizando a ERIC-PCR permite discriminar linhagens em nível de subespécies devido à ampla distribuição desses elementos no genoma de vários membros das enterobactérias (7).

A região intergênia consenso é uma seqüência altamente conservada de 126 pares de base encontradas nas *Enterobacteriaceae*. Na ERIC-PCR é utilizada uma combinação de *primers* designados para a conservação da região ERIC, e para gerar na eletroforese um padrão de bandas baseado na frequência e na orientação da seqüência ERIC no genoma bacteriano (7).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de resistência da *E. coli* aos antibióticos mais utilizados para infecção do trato urinário não complicada, associando-o com dados demográficos, fatores de risco e genotipagem.

PACIENTES E MÉTODOS

Dados dos pacientes e considerações éticas

Foram avaliados 62 pacientes femininas, com idade superior a 18 anos, com diagnóstico de ITU não complicada, em regime ambulatorial, na cidade de Santa Cruz do Sul-RS. No

período de julho de 2004 a julho de 2006. As pacientes responderam a um questionário no qual constavam, além dos dados demográficos, os principais fatores de risco para ITU que incluem número de episódios de ITU apresentados, atividade sexual, idade da primeira infecção urinária, história de hospitalização prévia ou uso prévio de antibióticos nos últimos 2 meses e presença de animal de estimação em casa. Para todas as paciente foi solicitado cultura de urina com o respectivo antibiograma. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e da Universidade de Santa Cruz do Sul.

Diagnóstico laboratorial

A urina foi coletada por jato médio após higiene genital prévia e orientações. As amostras de urina foram cultivadas em Agar MacConkey e CLED, sendo que as que apresentaram um crescimento igual ou superior a 10^5 UFC/mL foram selecionadas para posterior identificação. As colônias lactose e indol positivo foram consideradas como *E. coli*. Os testes de suscetibilidade foram realizados no Laboratório Enzilab e Laboratório Santa Cruz, utilizando o método de difusão em disco em meio Mueller Hinton frente aos seguintes antibióticos: cefalexina (30ug), gentamicina (120ug), nitrofurantoina (300ug), norfloxacin (10ug) e sulfametoxazol-trimetoprim (1,25/23,75ug) (8).

Isolamento, extração do DNA e genotipagem.

A análise genotípica foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC. Foram colocados 100 µL dos isolados bacterianos para crescer em caldo BHI por 24 h a 37°C. Após as amostras foram plaqueadas em Agar nutriente, deixando por mais 24 h a 37°C. Foi retirada uma colônia isolada para um novo caldo BHI e incubado por mais 24 h a 37°C. O isolamento do DNA cromossomal foi realizado a partir de células bacterianas isoladas, segundo o método van Embden *et al.* (1993) (9).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada conforme descrito por Manges *et al.* (2001) (10) com adaptações. As condições de amplificação foram: 94°C por 2 min para desnaturação inicial por 1 ciclo, seguido de 35 ciclos com 94°C por 30 seg. para desnaturação, 52°C por 1 min para anelamento e 72°C por 5 min para extensão e mais 72°C por 1 min para extensão final por 1 ciclo. Os “primers” utilizados foram Eric1 (5'ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC3') e Eric2 (5'AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG3'), que amplificam a região intergênica.

O produto amplificado na reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão de corrida por 20 min a 80 V e mais 2 h a 118 V. Foram utilizados 12 µL da reação de PCR e 2 µL de tampão de amostra. A visualização foi realizada utilizando um transluminador em comprimento de onda de 312 nm. Para o registro foi utilizado o sistema de foto-documentação (Vilber Lourmat). A análise *in silico* no Software Gelcompar foi realizada utilizando como parâmetro a análise visual dos géis de agarose.

Análise estatística

Os dados obtidos foram tabulados em uma planilha Excel e posteriormente exportados para o programa SPSS. V. 14.0 para análise estatística. As variáveis quantitativas foram descritas pela média e desvio padrão e as categóricas pela frequência absoluta e frequência relativa percentual. As variáveis categóricas foram comparadas pelo teste de Qui-quadrado com correção de Yates ou pelo teste Exato de Fischer. Os perfis de resistência foram comparados entre os antibióticos pelo teste de McNemar. Foi considerado um nível de significância de 5%.

RESULTADOS

As pacientes eram brancas em sua maioria (97%) e 36 pacientes (58%) apresentaram mais do que 3 episódios de ITU. A maioria das pacientes relatou desenvolver ITU pela primeira vez na idade adulta (80,6%) e ter vida sexual ativa (80,6%). Os sintomas mais comuns foram disúria (53%) e aumento da frequência urinária (50%). Em 82% das pacientes não houve história prévia de hospitalização nos 2 meses precedentes ao episódio de ITU e 32% revelaram ter usado antibiótico nos últimos 2 meses previamente ao aparecimento da ITU. Cinco pacientes (8%) eram diabéticas e 40 pacientes (64%) revelaram ter animal de estimação em casa.

A Figura 1 mostra os percentuais de resistência aos antibióticos em estudo observando-se índices elevados de resistência para cefalexina e SMT, 19% e 22% respectivamente, e índices não muito elevados para norfloxacin (8,0%), para gentamicina (4,8%) e para nitrofurantoína (3%).

Em relação à sintomatologia apresentada, foi observado que os pacientes que tiveram dor lombar, 42,3% apresentaram menos de 3 episódios de ITU enquanto 11,4% com esta sintomatologia apresentaram mais de 3 episódios ($p=0,014$).

Outro fator de risco foi a hospitalização nos últimos 2 meses previamente ao episódio de ITU atual. Observou-se que 26,9% das pacientes com menos de 3 episódios de ITU relataram

história de hospitalização prévia contra 8,3% dos pacientes com mais de 3 episódios ($p=0,08$). A genotipagem dos isolados através do ERIC-PCR permitiu a classificação em 2 grupos: um formado por bactérias que apresentaram em sua análise genotípica uma relação clonal, o que significa observação na eletroforese de padrões idênticos no número e na posição das bandas (Figura 3). Este grupo totalizou 29 amostras. O outro grupo foi constituído por bactérias que não apresentaram relação clonal formado por 33 amostras (53,3%).

A análise visual da genotipagem e a análise *in silico* no Software Gelcompar permitiram caracterizar 8 distintos grupos clonais, sendo que 29 (46,7%) isolados uropatogênicos fizeram parte destes grupos. Os padrões resultantes da ERIC-PCR foram identificados com letras, sendo que D, E, F, G, I, X, Cc e Hh foram caracterizados como grupos clonais. A Figura 3 apresenta o resultado da ERIC-PCR de alguns isolados clínicos, onde é possível observar alguns isolados que apresentaram padrões eletroforéticos indistinguíveis.

A Figura 4 apresenta o dendrograma gerado pela análise *in silico* no Software GelCompar, no qual o percentual de similaridade gerado pela ERIC-PCR pode ser observado a esquerda dos perfis identificados no estudo.

A maioria dos clones foi formada por dois isolados, no entanto os grupos clonais G e I foram formados, respectivamente, por 12 e 5 isolados, representando 58,6% dos grupos clonais identificados (Tabela 2). No grupo clonal G, 83% dos pacientes relataram ter uma vida sexual ativa e todos desenvolveram a primeira infecção no trato urinário na vida adulta. No grupo clonal I todos relataram ter uma vida sexual ativa e 80% desenvolveram a primeira infecção na fase adulta. Cinquenta por cento dos isolados pertencentes ao grupo clonal G apresentaram resistência a, pelo menos, um antibiótico, sendo que 25% apresentaram resistência à SMT; 25%, à Ampicilina; 25%, à Cefalexina e 8,3% apresentaram resistência à Norfloxacin. No grupo clonal I, 20% das amostras demonstraram resistência à Norfloxacin.

A classificação dos isolados de *E. coli*, quanto ao resultado da genotipagem, revelou que não há diferença significativa na resistência aos antibióticos entre os grupos. Apenas a nitrofurantoína demonstrou um percentual superior de resistência nos grupos clonais (Figura 2).

A Tabela 1 apresenta as variáveis clínicas dos pacientes portadores de *E. coli* classificados segundo a relação clonal. Todas estas variáveis apresentaram distribuição semelhante entre os dois grupos.

DISCUSSÃO

A infecção do trato urinário (ITU) é uma doença comum na mulher jovem e sexualmente ativa (10,11). Neste estudo, 80% das mulheres apresentaram o primeiro episódio de ITU na idade adulta e a grande maioria era sexualmente ativa. Um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento de ITU na mulher é a relação sexual (1, 12, 13). A fonte das bactérias uropatogênicas, em geral, é proveniente da microbiota fecal que coloniza as regiões perineal, vaginal e periuretral (1,13). Por via ascendente essas bactérias podem colonizar também o trato urinário, especialmente nas mulheres, por apresentarem a uretra mais curta e, portanto, com maior proximidade do ânus, vestíbulo vaginal e uretra (1, 12, 13). Além da atividade sexual, o uso de antibióticos para outras situações clínicas pode também se associar com infecção urinária. Na mulher normal, que nunca apresentou ITU, a principal flora no intróito vaginal e uretral consiste de lactobacilos e estafilococos que funcionam como protetores da colonização por outras bactérias uropatogênicas (12). O uso de antibióticos pode alterar essa microflora vaginal normal, facilitando a colonização vaginal pela *E. coli* (12). Neste estudo, 32% das pacientes usaram antibióticos nos últimos 2 meses antes do aparecimento da infecção do trato urinário. Eles podem ter tido um papel importante na alteração da flora vaginal normal e ter contribuído para o desenvolvimento de infecção urinária nestas pacientes.

O tratamento empírico dos pacientes com infecção urinária não complicada tem sido realizado nos últimos anos considerando a previsibilidade do agente etiológico que, na maioria das vezes, continua sendo a *Escherichia coli* e sua sensibilidade aos antimicrobianos (1,11). A Sociedade Americana de Infectologia recomendou o uso de SMT, em 1999, como droga de primeira escolha para o tratamento de infecção urinária não complicada por apenas três dias (4). No entanto uma alta prevalência de resistência da *E. coli* à SMT tem sido documentada nos últimos anos questionando o uso desta droga como primeira escolha no tratamento empírico destes pacientes (1, 10, 14, 15). Neste estudo, demonstrou-se que a resistência à SMT apresentada pela *E. coli* é elevada, atingindo uma prevalência de 22%. É preconizado que quando a prevalência de resistência for maior do que 20%, a SMT não deveria ser utilizada como droga de primeira escolha para tratamento empírico de infecção urinária. Qual seria a alternativa para o tratamento empírico destas pacientes? Uma opção são as drogas do grupo das quinolonas, especificamente a norfloxacina que apresenta boa atividade contra a *E. coli* em diferentes partes do mundo (1, 10, 14).

A norfloxacina tem sido uma opção de tratamento empírico de pacientes com infecção urinária, mas existe também a preocupação do aumento da resistência ao grupo das

quinolonas (1,14). Nos últimos anos o uso de fluorquinolonas para tratar ITU ou outras infecções, especificamente do trato respiratório, tem aumentado dramaticamente a resistência da *E. coli* a estes agentes antimicrobianos (4, 11, 14). Se esta tendência continuar no futuro o mesmo problema da resistência da *E. coli* aparecerá como aconteceu com a ampicilina, amoxicilina e SMT. Essa preocupação é ainda maior porque as quinolonas são drogas usadas em muitas outras situações clínicas como nas infecções respiratórias, intestinais e outras. Portanto as fluorquinolonas não deveriam ser recomendadas como terapia inicial empírica a menos que a prevalência de resistência à SMT seja maior do que 20% e outras drogas não possam ser utilizadas (1, 4, 14). Neste estudo, a resistência à norfloxacin foi de 8,3% que ainda pode ser considerada baixa, mas tem um potencial de aumento da resistência se nos próximos anos seu uso não for restringido. É importante que o uso indiscriminado das quinolonas como drogas de primeira escolha no tratamento da cistite seja abolido devido ao potencial de se tornar um problema sério de saúde pública.

A melhor opção para o tratamento empírico da infecção urinária não complicada é a nitrofurantoína (1, 14). De fato, neste trabalho, a resistência à nitrofurantoína foi muito baixa, de apenas 3%, a mais baixa entre todas as drogas testadas, incluindo a gentamicina que foi de 4,8%. Além disto, esta droga tem a vantagem de ser utilizada apenas como tratamento e profilaxia de pacientes com infecção urinária. A resistência da *E. coli* a esta droga é muito baixa em diferentes regiões da Europa e Estados Unidos, mesmo depois de 50 anos de uso (11). Há pouca evidência para demonstrar que um regime de 3 dias de nitrofurantoína é tão efetivo quanto 3 dias de SMT ou quinolona (4). Alguns clínicos se preocupam com a recomendação do uso de nitrofurantoína por sete dias que pode levar a uma diminuição da aderência a esse regime de tratamento.

Estudos de epidemiologia molecular têm auxiliado a esclarecer a relação bactéria-hospedeiro, as bases filogenéticas e as vias de transmissão de *E. coli* através da associação entre variáveis, sejam elas demográficas, relacionadas a fatores de risco ou perfil de resistência no intuito de identificar elementos que possam auxiliar no raciocínio clínico para o tratamento empírico (6, 7, 18, 19). Ainda que a infecção do trato urinário não seja considerada uma doença que ocorra por surtos na comunidade, certas linhagens de *E. coli* como a 015:K5 2:H1 pode causar surtos de cistite e pielonefrite como documentado por Phillips et al., em Londres, no final da década de 1980 (19). Além disso, é considerada uma causa endêmica de infecção urinária em outros lugares da Europa tendo também como importante característica a resistência à SMT (20,21). Dados semelhantes têm sido encontrados em diferentes áreas geográficas nos Estados Unidos onde a identificação de isolados de *E. coli* com as mesmas características genéticas também apresenta resistência à SMT (10).

Neste trabalho, procurou-se identificar a presença de grupos clonais associados com a resistência da *E. coli* aos antibióticos e às características clínicas apresentadas pelas pacientes. A genotipagem dos isolados através da ERIC-PCR identificou 8 distintos grupos clonais (Figura 4) das quais fizeram parte 29 amostras (46,7%). A maioria dos grupos clonais foi formada por dois isolados, no entanto o grupo G e I foram formados, respectivamente, por 12 e 5 isolados, representando 58,6% dos grupos clonais identificados. Manges et al (2001) identificaram, através da ERIC-PCR, o grupo clonal A, presente em isolados obtidos de pacientes da Califórnia, onde 51% (28/55) eram resistentes à SMT (10). O mesmo grupo clonal A foi identificado em isolados obtidos em Minnesota e em Michigan, onde respectivamente, 39% (7/18) e 38% (11/29) dos isolados que fizeram parte deste grupo apresentavam resistência à SMT (10). Neste estudo, no grupo clonal G, 25% (3/12) dos isolados foram resistentes à SMT. Os isolados que fizeram parte dos grupos clonais não compartilharam o mesmo perfil de resistência aos antibióticos, confirmando o observado por Eom et al. (18). Há uma diversidade genética dos isolados na comunidade e a resistência pode surgir independentemente da relação clonal. Porém Solberg et al. (2006) observaram que os isolados de *E. coli* identificados como grupo clonal A resistentes à SMT podem ter adquirido resistência em situação anterior à transmissão na comunidade (21).

A comparação das variáveis clínicas das pacientes portadoras de linhagens pertencentes aos grupos clonais com as pacientes portadoras de linhagens não pertencentes aos grupos clonais não revelou diferenças estatisticamente significante (Tabela 2). Portanto não foi possível caracterizar situações clínicas ou comportamentais das pacientes entre os grupos clonais. Contudo cabe salientar que mais isolados clínicos devam ser analisados para comprovar a ausência de relação entre os grupos clonais e as pacientes. Outra situação relevante que deve ser averiguada refere-se às pacientes com episódios repetidos de ITU, buscando caracterizar genotipicamente se as cepas causadoras destes episódios são as mesmas ou se ocorreu uma nova infecção.

Concluiu-se que o perfil de resistência da *E. coli* aos antibióticos mais utilizados mostrou uma prevalência de resistência elevada à SMT (22%). Sugere-se que a melhor opção para o tratamento empírico inicial para infecção urinária não complicada deve ser com a nitrofurantoína. A análise genotípica dos isolados revelou a inexistência de características específicas entre os grupos clonais.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer a Dra Maria Lúcia Rosa Rossetti e a Doutoranda Lia Gonçalves Possuelo pela cedência e auxílio nas análises *in silico*. Ao Dr. Lee W Riley pela doação dos primers e valioso estímulo.

REFERÊNCIAS

1. Nicolle L Anderson P, Zhanel G. Uncomplicated urinary tract infection in women. *Can Fam Physician* 2006;52:612-8.
2. Karlowsky J, Kelly L, Thornsberry C, Jones M, Sahm D. Trends in Antimicrobial Resistance among Urinary Tract Infection Isolates of *Escherichia coli* from Female Outpatients in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002; Aug 2540-5.
3. Zhanel G, Hisanaga T, Laing N, DeCorby M, Johnson J, Nicolle L. Antibiotic resistance in outpatient urinary isolates: final results from the North American Urinary Tract infection Collaborative Alliance (NAUTICA). *International Journal of Antimicrobial Agents* 2005; 26:380-8.
4. Warren JW, Abrutyn E, Hebel R, Johnson JR, Stamm WE. Guidelines for antimicrobial treatment of uncomplicated acute bacterial cystitis and acute pyelonephritis in women. *Clinical Infections Diseases* 1999; 29:745-58.
5. Miller LG, Tang A. Treatment of Uncomplicated Urinary Tract Infections in Era of Increasing Antimicrobial Resistance. *Mayo Clin Proc* 2004;79(8):1048-54.
6. Riley LW. *Molecular Epidemiology of Infections Diseases – Principles and Practice*, 2004. ASM Press, Washington, DC.
7. Johnson JR, Russo TA. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*; *International Journal of Medical Microbiology* 2005; 295: 383-404.
8. Kiehlbauch JA, Hannet GE, Salfinger M, Archinal W, Monserrat C, Carlyn C. Use of National Committee for Clinical Laboratory Standards guidelines for disk diffusion susceptibility testing. *J Clin Microbiol*; 2000; 38(9): 3341-8.
9. van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Shinnick TM, McAdam R, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology 1993;31(2):406-9.
10. Manges AR, Johnson JR, Foxman B, Riley LW. Widespread distribution of urinary tract infections caused by amultidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group. *The New England Journal of Medicine* 2001; 345(14):1007-13.
11. Hooton TM, Besser R, Foxman B, Nicolle LE. Acute uncomplicated Cystitis in a Era of increasing antibiotic resistance: a proposed approach to empirical therapy. *Clinical Infections Diseases* 2004; 39:75-80.
12. Finer G, Landau D: Pathogenesis of urinary tract infections with normal female anatomy. *Lancet Infect Dis* 2004;4(10):631-5.
13. Foxman B, Manning SD, Tallman P: Uropathogenic *Escherichia coli* are more likely than commensal *E.coli* to be shared between heterosexual sex partners. *Am J Epidemiol* 2002;156:1133-40.

14. Wagenlehner F, Naber K. Treatment of bacterial Urinary Tract Infections: Presence and future; *European Urology* 2006; 49:235-44.
15. Gupta K. Addressing antibiotic resistance. *Dis Mon* 2003;49:99-110.
16. Burman WJ, Breese PE, Murray BE, Mehler PS. Conventional and molecular epidemiology of SMT resistance among Urinary *Escherichia coli* isolates; 2003;115:358-64.
17. Mehnert SA. Diagnosis and management of uncomplicated Urinary Tract Infections; 2005;72(3):451-6.
18. Eom JS, Hwang BY, Sohn JW, Kim WJ, Kim MJ, Park SC, et al. Clinical and molecular epidemiology of quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection. *Microb Drug Resist* 2002;42(4):1785-6.
19. Phillips I, Eykyn S, King A. Epidemic multiresistant *Escherichia coli* infection in West Lamberth Health District. *Lancet* 1988;1:1038-41.
20. Prats G, Navarro F, Mirelis B. *Escherichia coli* serotype 015:k52:H1 as a uropathogenic clone. *J Clin Microbiol* 2000;38:201-9.
21. Solberg OD, Ajiboye RM, Riley LW. Origin of class 1 and 2 integrons and gene cassettes in a population-based sample of uropathogenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2006; 44:1347-51.

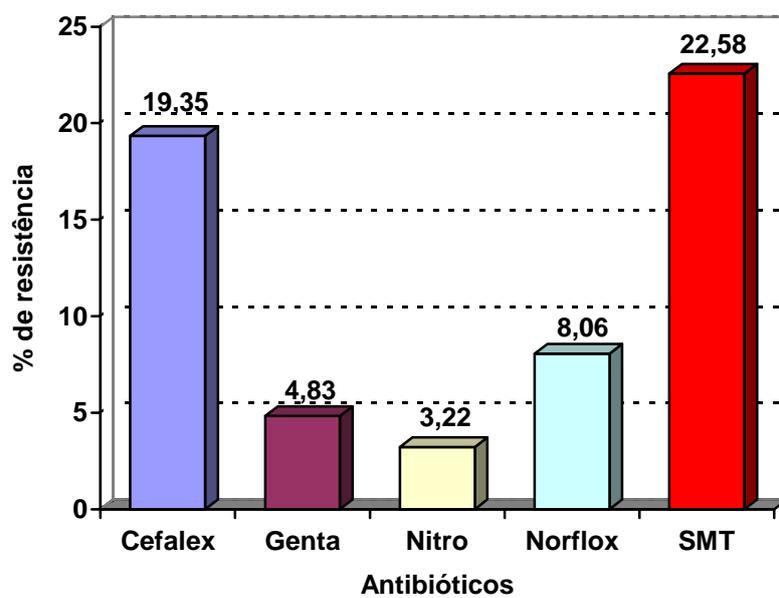


Figura 1 - Perfil de resistência dos isolados de *E. coli* analisados.

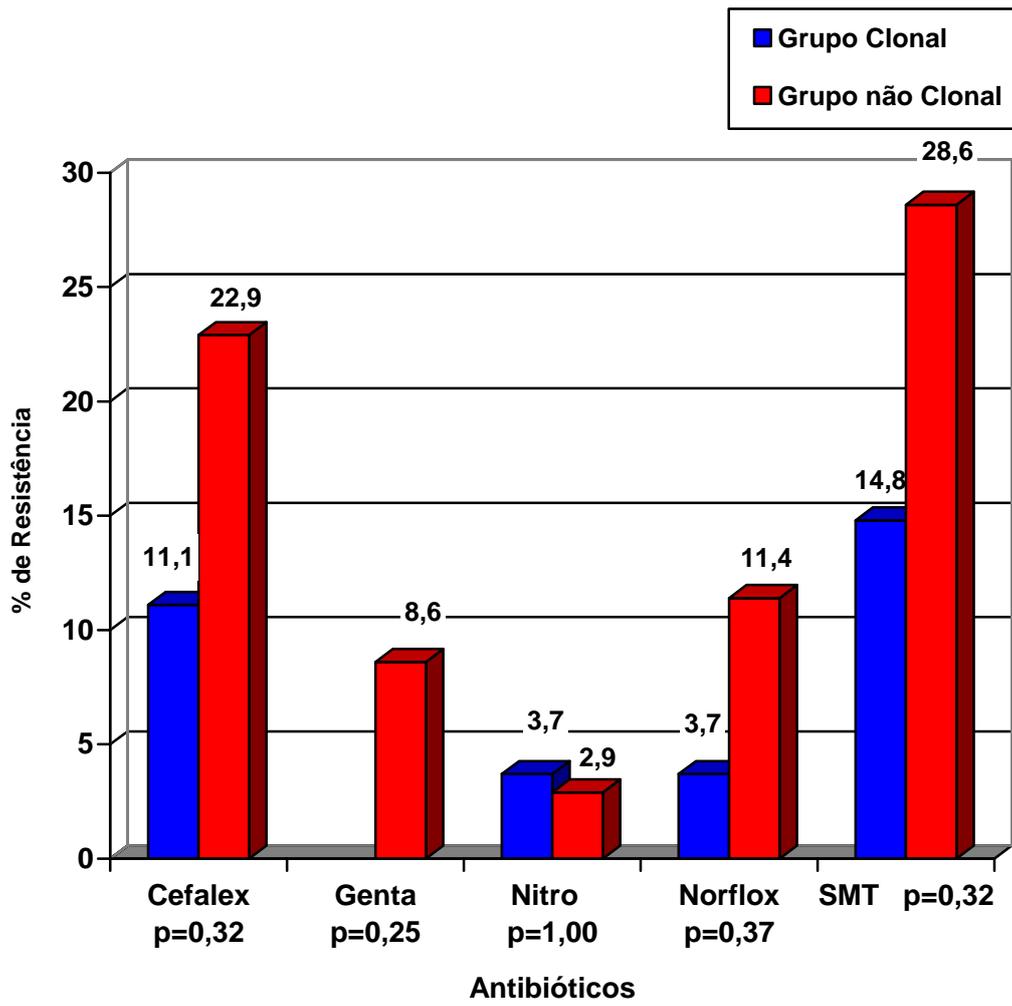
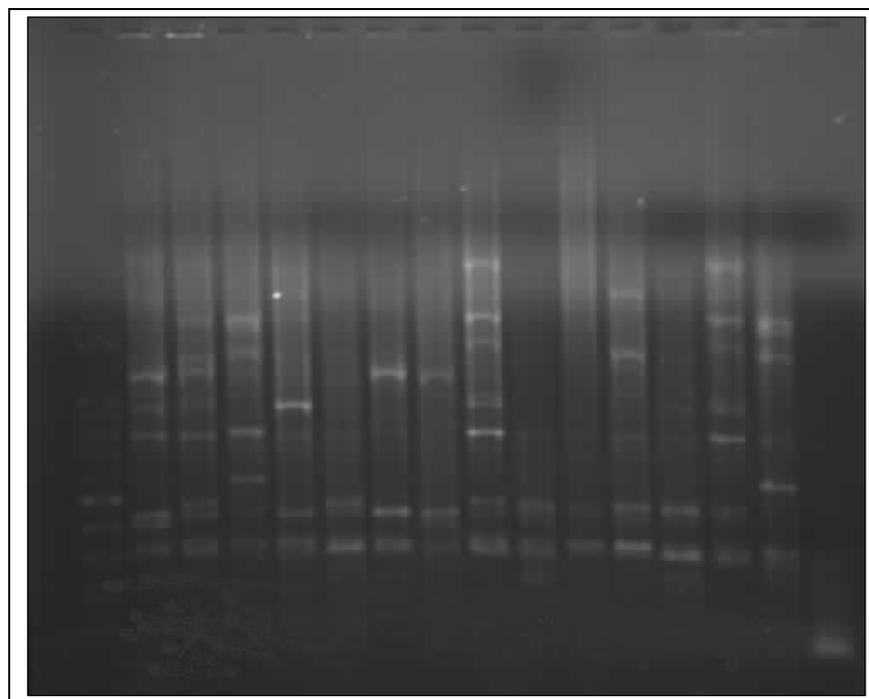


Figura 2 - Perfil de resistência por grupo

M CP 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 CN



G I I Cc G G Cc

Figura 3 - Visualização da ERIC-PCR em gel de agarose 1,5% que permite observar isolados clones: isolados 38, 43 e 45 pertencentes ao grupo clonal G, isolados 39 e 40 grupo clonal I e isolados 41 e 46 ao grupo clonal Cc.

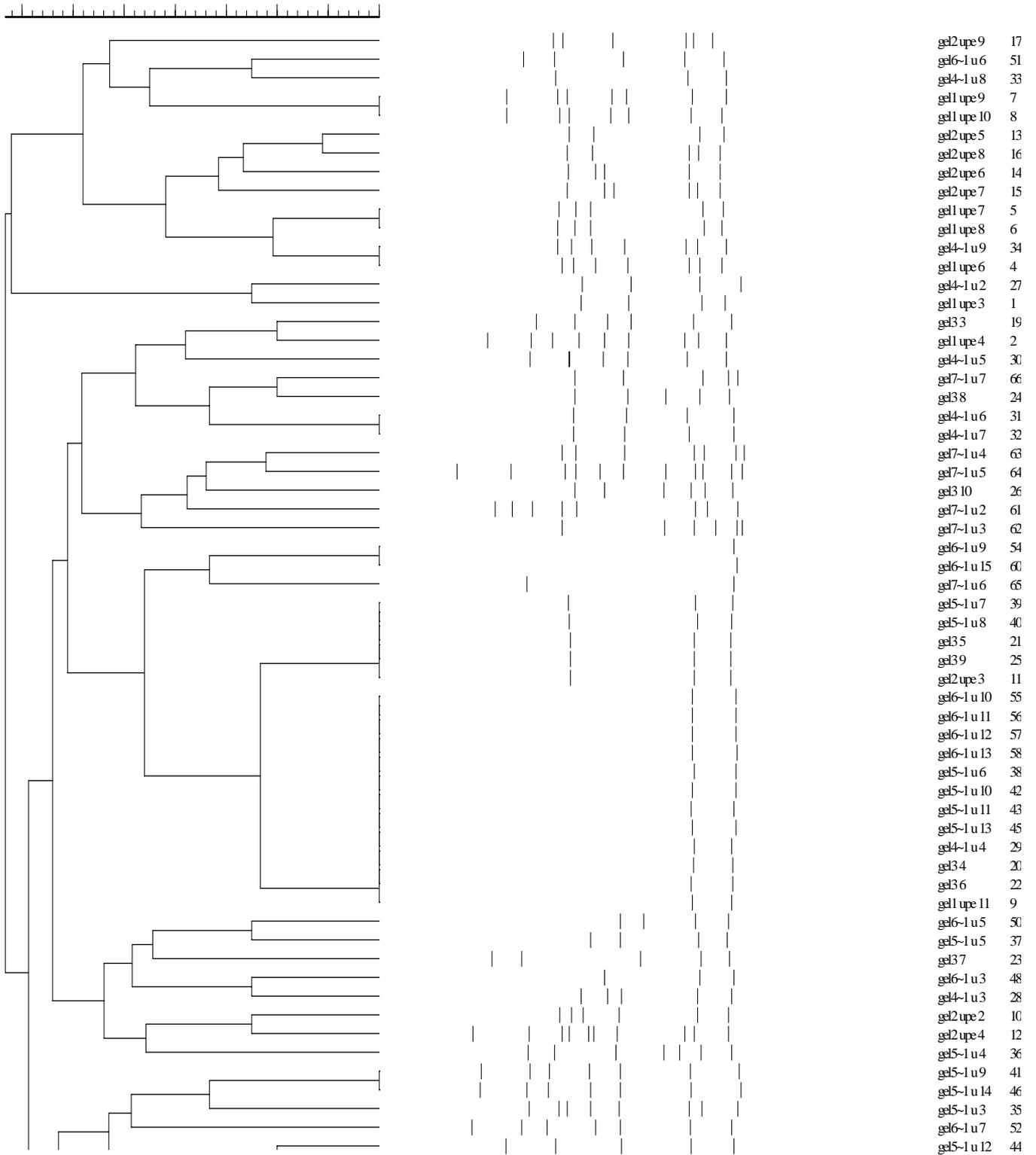


Figura 4 - Dendrograma de 60 isolados obtidos através da análise computacional.

Tabela 1 - Dados clínicos, conforme resultado de genotipagem.

Dados Clínicos	Grupo Clonal n = 27	Grupo Não Clonal n = 35	Valor p
Menos que 3 episódios de ITU	18 (64,3%)	18 (52,9%)	0,52
Mais que 3 episódios de ITU	10 (35,7%)	16 (47,1%)	0,52
ITU na infância	2 (7,40%)	4 (11,4%)	0,68
ITU na adolescência	2 (7,40%)	4 (11,4%)	0,68
ITU adulto	24 (88,8%)	26 (74,3%)	0,71
Atividade sexual	23 (85,25)	27 (77,15)	0,63
Doença Renal	9 (33,35)	9 (25,75)	0,7
Disúria	14 (51,9%)	19 (54,3%)	1
Frequência urinária	14 (51,9%)	17 (48,6%)	1
Dor lombar	6 (22,2%)	9 (25,7%)	0,98
Febre	3 (11,1%)	8 (22,9%)	0,32
Odor forte	10 (37,0%)	10 (28,6%)	0,66
Dor pélvica	7 (25,9%)	6 (17,1%)	0,59
Hospitalização prévia	5 (18,5%)	6 (17,1%)	1
Uso prévio de antibiótico	9 (33,3%)	11 (31,4%)	1
Diabetes	1 (3,7%)	4 (11,4%)	0,37
Animal de estimação	15 (55,6%)	25 (71,4%)	0,28

Tabela 2 - Apresenta os grupos clonais, a quantidade de isolados e os números de identificação dos isolados (n = 29).

Grupo Clonal	Nº de isolados (%)*	Nº correspondentes
D	2 (7)	4 e 34
E	2 (7)	5 e 6
F	2 (7)	7 e 8
G	12 (41)	9, 55, 56, 57, 58, 38, 42, 43, 45, 29, 20 e 22
I	5 (17)	39, 40, 21, 25 e 11
X	2 (7)	31 e 32
Cc	2 (7)	41 e 46
Hh	2 (7)	54 e 60

* Percentual calculado sobre o número de isolados em grupo clonal.